

®

**INSTYTUT CHEMII
I TECHNIKI JĄDROWEJ
INSTITUTE OF NUCLEAR
CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

WARSZAWA

RAPORTY IChTJ. SERIA B nr 1/96

**TEST KOMETKOWY.
1. TEORIA I PRAKTYKA**

**Marcin Kruszewski, Maria Wojewódzka,
Teresa Iwaneńko**

Warszawa 1996

ZESPÓŁ REDAKCYJNY

dr Wiktor Smutek, Ewa Godlewska, Sylwester Wojtas

WYDAWCA

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
tel.: (0-22) 11 06 56; telex: 813027 ichtj pl; fax: (0-22) 11 15 32;
e-mail: sekdyrn@orange.ichtj.waw.pl

Raport został wydany w postaci otrzymanej od Autorów

Test kometkowy. 1. Teoria i praktyka

Test kometkowy - to nowa metoda oznaczania pęknięć nici DNA. Stanowi przydatne narzędzie do badania uszkodzeń DNA na poziomie komórkowym. Obecnie metodą tą można wykryć pojedynczo- i podwójnoniciowe pęknięcia DNA, uszkodzenia oksydacyjne, dimery pirymidynowe i fotoprodukty 6-4, wiązania krzyżowe DNA-DNA i DNA-białko. Metoda znalazła zastosowanie w badaniach uszkodzeń DNA i ich naprawy.

Comet assay. 1. Theory and practice

Comet assay is a new method for measuring DNA breakage in a single cell. The main applications of the method are estimation of DNA single and double strand breaks, oxidative damage, pyrimidine dimers and (6-4)photoproducts, DNA-DNA and DNA-protein crosslinks. The method is used for studying DNA damage and its repair.

SPIS TREŚCI

1. Ogólne założenia metody kometkowej	7
2. Zastosowanie praktyczne	8
2.1. Badanie uszkodzeń DNA i ich naprawy	8
2.2. Zastosowanie w medycynie	9
2.3. Badanie genotoksyczności różnych związków chemicznych	9
2.4. Biomonitoring	9
2.5. Ocena napromienienia żywności	9
3. Badania własne	10
3.1. Materiał i metody	10
3.1.1. Przygotowanie komórek	10
3.1.2. Warunki napromienienia	10
3.1.3. Liza	10
3.1.4. Zastosowanie enzymów ENDO III i FPG	10
3.1.5. Elektroforeza	10
3.1.6. Komputerowa analiza obrazu	11
3.2. Wyniki	11
4. Podsumowanie	16
5. Literatura	16

1. OGÓLNE ZAŁOŻENIA METODY KOMETKOWEJ

Cząsteczka DNA eukariotycznego ma 50-100 μm długości i musi być upakowana w jądrze o średnicy 5-10 μm . Pęknięcie nici DNA powoduje relaksację superzwinięcia i powstanie rozwiniętej struktury DNA, którą można zmierzyć wizualnie lub analizując jej właściwości sedymentacyjne. Rydberg i Johanson [1] wykazali, że jądra poddane lizie w warunkach alkalicznych pozostają stosunkowo skondensowanymi strukturami, natomiast po napromienieniu promieniowaniem jonizującym stają się bardziej rozluźnione, a rozluźnienie to jest zależne od dawki promieniowania. W celu polepszenia czułości metody Östling i Johanson [2] poddali elektroforezie komórki umieszczone w agarozie na szkiełku mikroskopowym i stwierdzili, że przesunięcie DNA w kierunku anody jest proporcjonalne do dawki promieniowania X jaką napromieniono badane komórki. Taka procedura nieznacznie zmodyfikowana przez Singha i wsp. [3], którzy zastosowali alkaliczny (pH 11) bufor do elektroforezy, stanowi podstawę stosowanego obecnie testu kometkowego.

Zawiesinę komórek w agarozie o niskiej temperaturze krzepnięcia nanosi się na podstawowe szkiełko mikroskopowe i po zestaleniu się warstwy agarozowej komórki poddaje się lizie w obecności detergentu i elektroforezie niskonapięciowej. Po elektroforezie preparat zobojętnia się i barwi barwnikiem fluorescencyjnym interkalującym z DNA. Wybarwiony DNA ogląda się w mikroskopie fluorescencyjnym, oceniając uszkodzenia DNA. DNA można wybarwiać także srebrem, a uszkodzenie ocenia się wtedy w zwykłym mikroskopie świetlnym. Zachowanie się DNA tak traktowanych komórek nie jest do końca jasne; interpretacja opiera się na założeniu zaproponowanym w 1984 roku przez Ostlinga i Johansona [2]. Jak już wspomniano, DNA w jądrze komórkowym jest ściśle upakowany, jednakże wprowadzenie pojedynczonicowego pęknięcia nici DNA powoduje relaksację takiej struktury. Zastosowanie wysokiego pH i stężenia soli w procesie lizy i elektroforezy powoduje oddysocjowanie większości białek macierzy jądrowej oraz rozerwanie wiązań wodorowych pomiędzy niciami DNA, co jeszcze bardziej ułatwia relaksację superzwinięcia nici DNA oraz powoduje ujawnianie się tzw. miejsc labilnych w pH alkalicznym, a być może także zniszczenie miejsc przyczepu II rodzaju DNA do macierzy jądrowej [4]. Po przyłożeniu napięcia nici DNA są wywlekane z jądra w kierunku anody, powodując powstawanie tzw. "ogona" kometki. Część DNA, która nie uległa uszkodzeniu, pozostaje związana z macierzą jądrową tworząc "głowę" kometki. Całość oglądana w mikroskopie fluorescencyjnym przypomina kometę (rys. 1). DNA komórek nieuszkodzonych nawet po przyłożeniu napięcia pozostaje w obrębie jądra komórki (głowa komety) związany z macierzą jądrową (rys. 2). Barwienie oranżem akrydynowym, który inaczej wybarwia pojedynczo-, a inaczej podwójnonicowe kwasy nukleinowe pozwoliło stwierdzić, że w ogonie kometki znajduje się głównie pojedynczonicowy DNA, natomiast w głowie - głównie podwójnonicowy. Przy silnym uszkodzeniu DNA w ogonie kometki często obserwuje się fragmenty DNA zachowujące strukturę wyższego rzędu i prawdopodobnie połączone fragmentami pojedynczonicowego DNA.

Do oceny uszkodzeń nici DNA najczęściej stosuje się pomiar wielkości migracji DNA (długość kometki), stosunku średnicy głowy do średnicy ogona, średniej ważonej intensywności fluorescencji całej kometki lub tzw. momentu ogonowego, który jest iloczynem odległości od środka głowy do środka ogona i zawartości DNA w ogonie. Jednak najprostszym sposobem oceny uszkodzenia DNA za pomocą testu kometkowego jest bezpośredni pomiar długości ogona kometki w mikroskopie fluorescencyjnym za pomocą okularu miarowego lub pomiar długości ogona kometki na zdjęciach fotograficznych. Oba sposoby są powszechnie używane w wielu laboratoriach na świecie. Gedik i wsp. [5] zaproponowali uproszczony sposób oceny uszkodzeń DNA. Dzielią oni kometki na pięć klas jakościowych i określają częstość występowania poszczególnych klas w danym preparacie. Na tej podstawie szacują stopień uszkodzenia komórek. Gwałtowny wzrost zainteresowania

testem kometkowym w ostatnich latach spowodował powstanie bardziej obiektywnego sposobu oceny wielkości kometek, jakim jest wspomagany komputerowo system analizy obrazu mikroskopowego. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego, poprzez kamerę CCD, przekazywany jest do komputera, gdzie następuje jego obróbka i ocena wybranych parametrów kometki.

2. ZASTOSOWANIE PRAKTYCZNE

2.1. Badanie uszkodzeń DNA i ich naprawy

Test kometkowy został wynaleziony jako test służący do oceny uszkodzeń DNA i jego główne zastosowania obejmują ocenę tych uszkodzeń.

Najprostszym i oryginalnym zastosowaniem testu kometkowego był pomiar pojedynczoniciowych pęknięć DNA mierzonych w warunkach denaturujących (pH 11) i ich naprawy. Badania Singha i wsp. [3, 6, 7] oraz późniejsze dobranie warunków elektroforezy przez Vijayalaxami'ego i wsp. [8] pozwoliło ustalić próg czułości metody na poziomie 0,05 Gy, a więc na poziomie porównywalnym z najczulszymi testami cytogenetycznymi, takimi jak test mikrojądrowy lub ocena liczby aberracji chromosomowych. Zmieniając nieco warunki prowadzenia testu i obniżając zasadowość buforów do lizy i elektroforezy Olive i wsp. [9] stosowali test kometkowy do określania liczby podwójnoniciowych pęknięć DNA i ich naprawy. Najniższą stosowaną przez autorów dawką uszkadzającą było 5 Gy promieniowania X. Dla porównania standardowa dawka promieniowania X używana do określenia liczby i naprawy podwójnoniciowych pęknięć DNA metodą PFGE wynosi około 2 Gy [10]. Jednakże interpretacja wyników [9] spotkała się z krytyką, ponieważ wydaje się, że pojedynczoniciowe pęknięcie DNA powoduje relaksację nici również w pH obojętnym (pH 9,6). Tym tłumaczy się podobne wyniki oznaczania w pH alkalicznym i obojętnym indukcji pęknięć nici DNA przez H_2O_2 [11].

Największe trudności metodyczne napotkano podczas badania uszkodzeń DNA nie będących pęknięciami nici, takich jak dimery pirymidynowe i fotoprodukty 6-4 wywołane przez UV oraz uszkodzenia oksydacyjne DNA wywołane przez aktywne formy tlenu. Uszkodzenia takie nie powodują relaksacji superzwinięcia chromatyny i nie mogą być wykryte standardowym testem kometkowym. Dopiero użycie specyficznych endonukleaz umożliwiło bezpośrednie badanie uszkodzeń DNA, innych niż pęknięcia nici. Endonukleazy specyficzne dla danego rodzaju uszkodzenia nacinają DNA w pobliżu takiego uszkodzenia, co można wykryć za pomocą testu kometkowego. Jako pierwszej, użyto endonukleazy V faga T4 rozpoznającej dimery pirymidynowe i miejsca apurynowe/apirymidynowe [12] do badania uszkodzeń DNA wywołanych w komórkach HeLa przez promieniowanie UV-C [5]. Obecnie na ukończeniu są prace z zastosowaniem innych enzymów, takich jak endonukleaza III (ENDO III), rozpoznająca miejsca apurynowe/apirymidynowe [13] czy Fapy glikozylaza (FPG) rozpoznająca formamidopirymidyny i 8-oksoguaninę [14].

Również pośrednio próbowano oznaczać inny rodzaj uszkodzeń DNA nie powodujących relaksacji nici DNA, wiązania krzyżowe DNA-DNA i DNA-białko. Oparto się na założeniu, że wzrost liczby wiązań krzyżowych hamuje migrację DNA wywołaną przez standardową dawkę czynnika uszkadzającego [15]. Założenie to, chociaż wydaje się być słusznym, w praktyce ma pewne ograniczenia. Przede wszystkim, niektóre związki chemiczne wywołują zarówno pęknięcia nici DNA, jak i wiązania krzyżowe (np. formaldehyd). Ponadto, niektóre związki chemiczne (np. etopozyd) powodują powstawanie obok wiązań krzyżowych DNA-DNA, także wiązań DNA-białko, które również hamują migrację DNA. Rozróżnienie poszczególnych rodzajów wiązań krzyżowych możliwe jest dopiero po trawieniu preparatu

proteinazą K. Tak więc, chociaż potencjalnie metoda kometkowa nadaje się również do oceny wiązań krzyżowych DNA to jej zastosowanie w tym przypadku wymaga dalszych badań.

2.2. Zastosowanie w medycynie

Innym ważnym zastosowaniem testu kometkowego jest jego użycie do oceny wrażliwości guzów na chemio- i radioterapię. Badanie takie umożliwia szybką i mało pracochłonną ocenę zasadności użycia chemio- lub radioterapii w przypadku określonego nowotworu oraz optymalizację i kontrolowanie procesu leczenia.

2.3. Badanie genotoksyczności różnych związków chemicznych

Za czynniki genotoksyczne uważa się związki chemiczne, które powodują uszkodzenia DNA i/lub zmieniają replikację lub przekazywanie materiału genetycznego. Najczęściej stosowane krótkoterminowe testy genotoksyczności to badanie uszkodzeń DNA, mutacji czy aberracji chromosomowych. Z uwagi na swoją czułość i możliwość mierzenia uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach test kometkowy znalazł szerokie zastosowanie do badania genotoksyczności *in vitro* i *in vivo*. Test kometkowy może być użyty do badania genotoksyczności praktycznie we wszystkich typach komórek eukariotycznych, przy założeniu, że z badanego materiału można otrzymać zawiesinę komórek. Test kometkowy wykorzystano między innymi do oceny genotoksyczności jonów metali *in vitro*, nitrozozwiązków *in vivo* oraz niektórych insektycydów i mutagenów. Ponieważ test kometkowy umożliwia oznaczenie uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach, możliwa jest ocena zmienności wrażliwości komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego [16].

2.4. Biomonitoring

Test kometkowy używany jest także do oceny uszkodzeń DNA w limfocytach krwi obwodowej ludzi poddanych działaniu różnych czynników, np. osób po wysiłku fizycznym. Ponieważ do wykonania testu potrzeba około 20 µl krwi, otrzymanej na przykład przez nakłucie palca, może on być użyty do monitorowania pracowników narażonych na działanie różnych szkodliwych czynników. Jednakże De Meo [17] obserwował duże wewnątrz- i międzypersoniczne zróżnicowanie w doświadczeniach *in vitro* na limfocytach ludzkich. Konieczne jest więc przeprowadzenie dokładnego wywiadu lekarskiego przed wykonaniem badań. Użycie innych komórek niż limfocyty pozwala na zmniejszenie zróżnicowania.

2.5. Ocena napromienienia żywności

Problem szybkiego odróżnienia żywności napromienionej od nienapromienionej nabiera coraz większego znaczenia, wraz z rozwojem handlu międzynarodowego i coraz powszechniejszego stosowania promieniowania jonizującego jako metody konserwacji różnych produktów spożywczych. Ponieważ żywność napromieniuje się bardzo dużymi dawkami promieniowania, test kometkowy umożliwia łatwe odróżnienie żywności napromienionej i nienapromienionej. Badania prowadzone na zamrożonym mięsie i szpiku kostnym wykazały przydatność testu kometkowego do badań tego typu [19]. Oprócz badania produktów pochodzenia zwierzęcego, prowadzi się także badania nad przystosowaniem testu kometkowego do badania produktów roślinnych.

3. BADANIA WŁASNE

3.1. Materiał i metody

Opracowano optymalne metody przeprowadzania testu kometkowego dla ludzkich limfocytów, komórek Hep G2 (ludzkie hepatocyty) i VH10 (ludzkie fibroblasty).

3.1.1. Przygotowanie komórek

Limfocyty otrzymywano z krwi pobranej z palca lub żyły od kilku różnych dawców. Ustalono optymalne warunki inkubacji krwi. Do pobranej do probówki z heparyną krwi (1 jednostka/ml krwi) w ilości około 30 μ l dodawano 1 ml pożywki RPMI 1640 (Sigma) wzbogaconej 10% cielęcej surowicy płodowej (Hungarpol) i przetrzymywano 2,5 godziny (w ciemności, w temperaturze pokojowej).

Komórki Hep G2 i VH10 pochodziły z hodowli *in vitro*. Nanoszenie na szkiełka i sposób napromienienia był podobny dla wszystkich typów komórek. Na powleczone 100 μ l agarozy (0,5% Agarose Typ I-A (Sigma), w wodzie redestylowanej) i wysuszone szkiełka podstawowe nakraplano 100 μ l zawiesiny komórek w 1% agarozie o niskim punkcie topnienia (Typ VII - Sigma) rozpuszczonej w PBS⁻, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i układano na metalowej płycie leżącej na powierzchni naczynia z lodem. Na jedno szkiełko nakładano około $2-5 \times 10^4$ komórek. Po zastygnięciu agarozy zdejmowano delikatnie szkiełka przykrywkowe i napromieniano komórki na szkiełkach podstawowych.

3.1.2. Warunki napromienienia

Komórki napromieniano w temperaturze 0°C za pomocą aparatu Stabilipan firmy Siemens przy napięciu 180 kV, natężeniu 18 mA i filtrze Cu 1mm. Moc dawki wynosiła 1,2 Gy/min.

3.1.3. Liza

Po napromienieniu szkiełka natychmiast umieszczano w roztworze lizującym: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 (Sigma), pH=10 na 1 godz. w temperaturze 4°C, w ciemności.

3.1.4. Zastosowanie enzymów ENDO III i FPG

Po lizie preparaty przemywano 3 x 5 min buforem (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA), w temperaturze 4°C. Na szkiełko nakraplano 50 μ l rozcienczonego w buforze enzymu, nakrywano szkiełkiem przykrywkowym i inkubowano w wilgotnym pojemniku 45 min (ENDO III) i 30 min (FPG) w temperaturze 37°C.

3.1.5. Elektroforeza

Następnie szkiełka podstawowe umieszczano w aparacie do elektroforezy w buforze do elektroforezy: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA (Sigma) i inkubowano przez 40 min w temperaturze 10°C, w celu umożliwienia denaturacji DNA. Elektroforezę prowadzono przez 25 min przy napięciu 1 V/cm w przypadku komórek Hep G2 i VH10 i 30 min przy napięciu 1,2 V/cm w przypadku limfocytów.

Wszystkie etapy przygotowania preparatów i elektroforezę prowadzono w czerwonym świetle w celu zabezpieczenia komórek przed dalszym uszkodzeniem.

Po elektroforezie szkiełka płukano trzykrotnie buforem neutralizującym (0,4 M Tris (Sigma), pH=7,5), osuszano z nadmiaru roztworu, barwiono 1 μ M roztworem DAPI (Sigma) i nakrywano szkiełkiem przykrywkowym. Preparaty pozostawiano w zamkniętym pudełku,

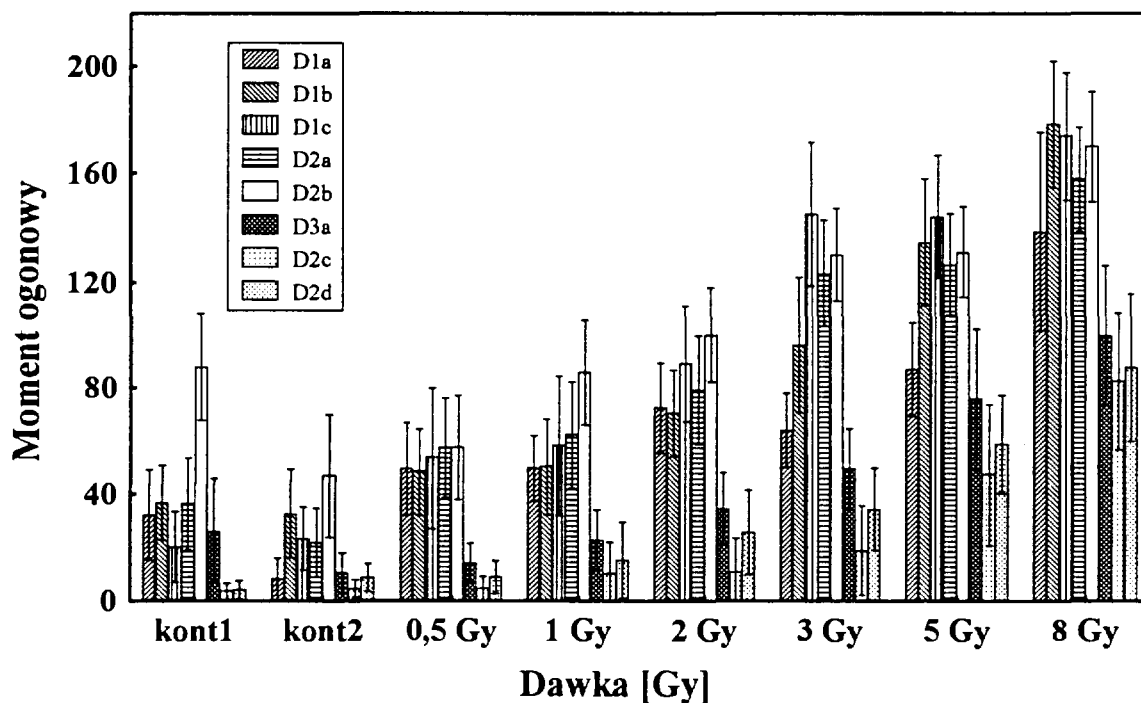
wyłożonym wilgotną bibułą, w lodówce na około 20 godz. Tak przygotowane preparaty mikroskopowe poddawano komputerowej analizie obrazu.

3.1.6. Komputerowa analiza obrazu

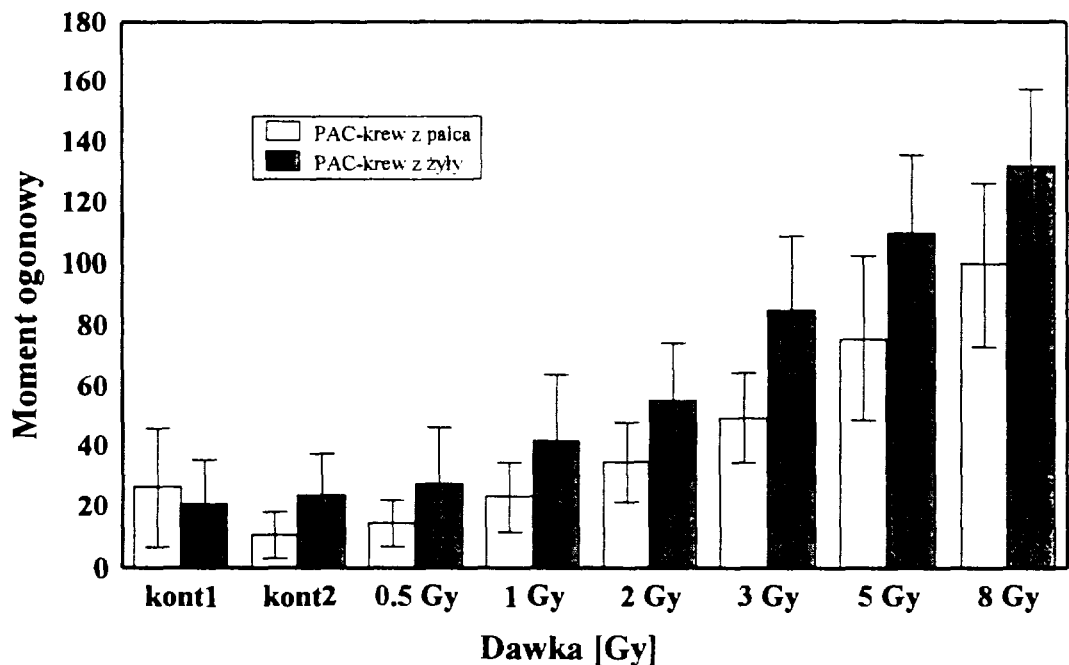
Obróbki obrazu komputerowego dokonywano za pomocą programu Comet v.3.0 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Program ten analizuje natężenie fluorescencji i na tej podstawie oblicza dla każdej komórki parametry charakteryzujące wielkość uszkodzenia DNA, takie jak procentowa zawartość DNA w „głowie” kometki, odpowiadającej jądra komórkowemu, oraz w „ogonie” kometki, odpowiadającemu DNA migrującemu w polu elektrycznym; długość „ogona” kometki oraz moment ogonowy (tail moment), czyli iloczyn procentowej zawartości DNA w „ogonie” i jego długości.

3.2. Wyniki

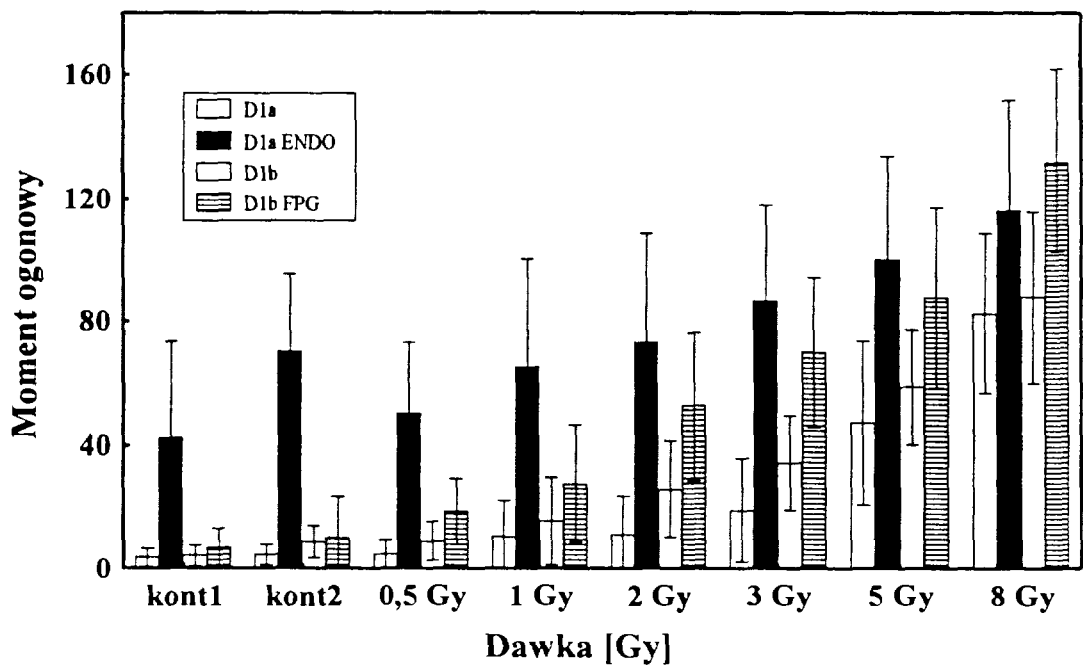
Dotychczas przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę uszkodzeń indukowanych przez różne dawki promieniowania X i nadtlenu wodoru w ludzkich limfocytach, komórkach Hep G2 i VH10. Zastosowano enzymy ENDO III i FPG. Poniższe rysunki przedstawiają uzyskane wyniki.



Rys.1. Uszkodzenia DNA indukowane różnymi dawkami promieniowania X w ludzkich limfocytach kilkakrotnie pobieranych od trzech różnych dawców, (D1, D2, D3 - dawcy; a, b, c - kolejne pobrania krwi; kont1 - limfocyty nienapromienione, liza bezpośrednio po nałożeniu komórek na szkiełko; kont2 - limfocyty nienapromienione, komórki pozostały na oziębionej płycie do zakończenia napromienienia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.

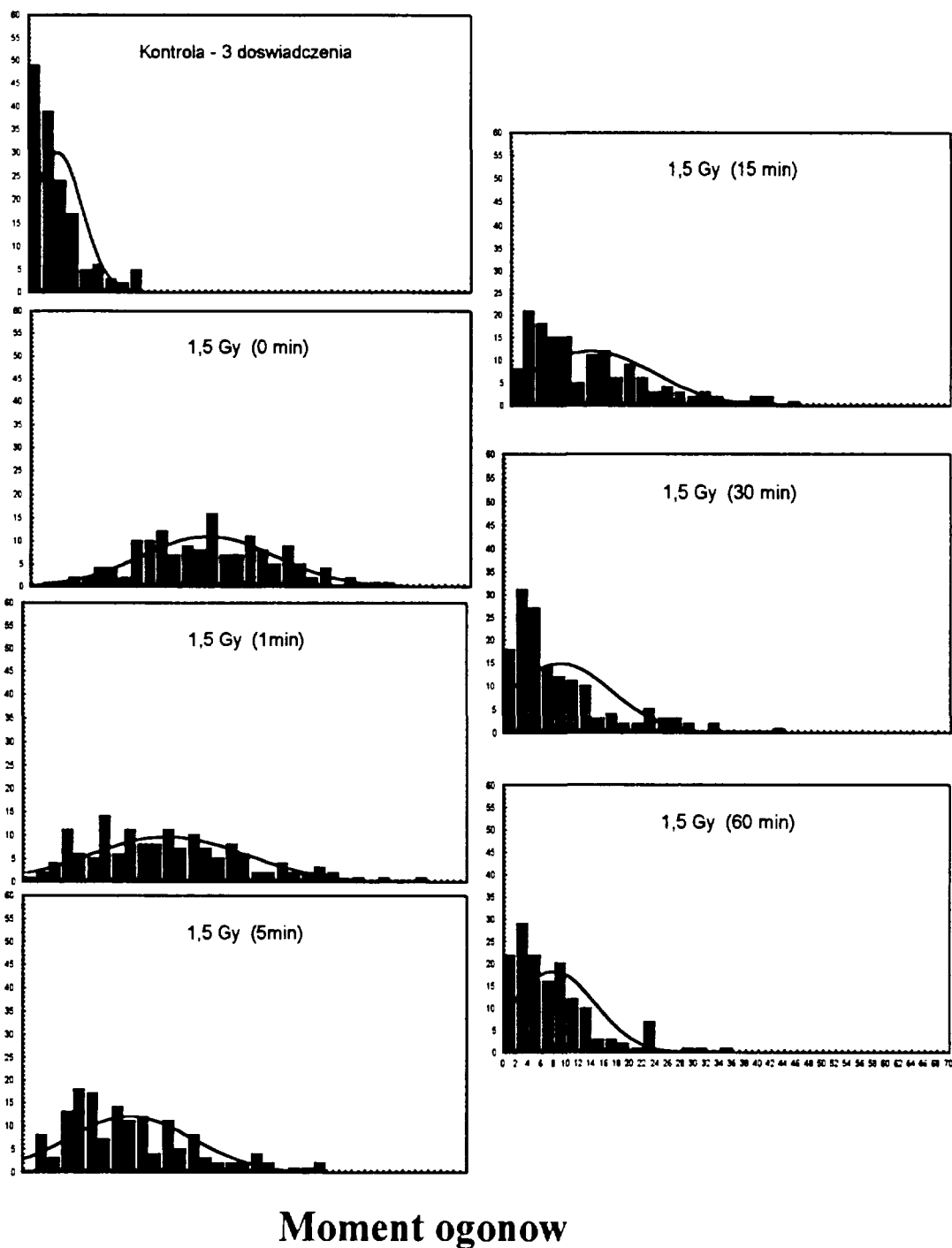


Rys.2. Różnice w uszkodzeniach DNA indukowanych różnymi dawkami promieniowania X w ludzkich limfocytach (krew pobierana z palca i żyły od tego samego dawcy): kont1 - limfocyty nienapromienione, liza bezpośrednio po nałożeniu komórek na szkiełka; kont2 - limfocyty nienapromienione, komórki pozostały na oziębionej płytce do zakończenia napromienienia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.

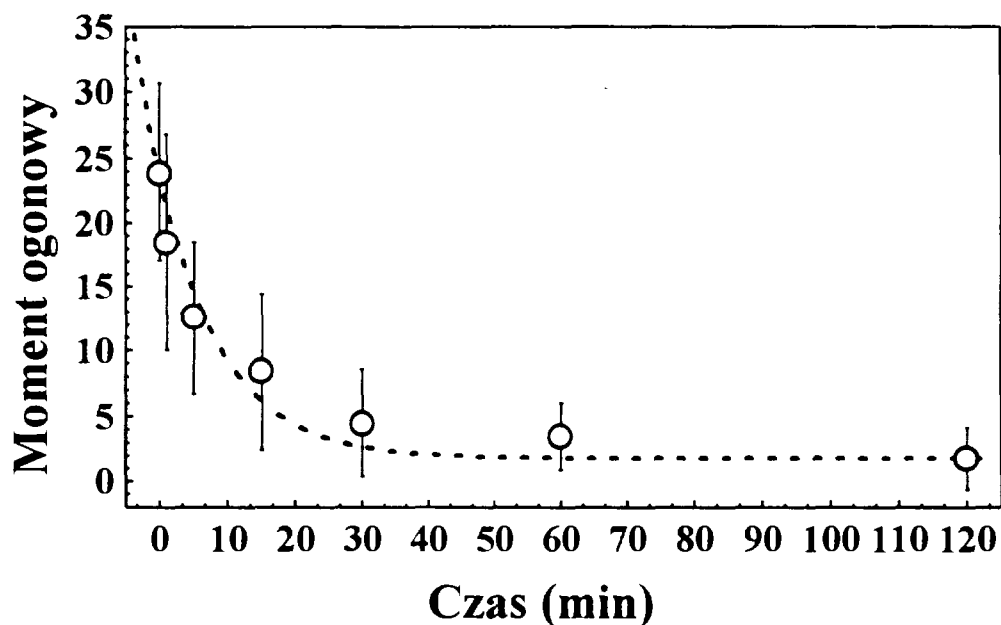


Rys.3. Uszkodzenia indukowane promieniowaniem X w limfocytach w obecności ENDO III i FPG: kont1 - limfocyty nienapromienione, liza bezpośrednio po nałożeniu komórek na szkiełka; kont2 - limfocyty nienapromienione, komórki pozostawały na oziębionej płytce do zakończenia napromienienia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.

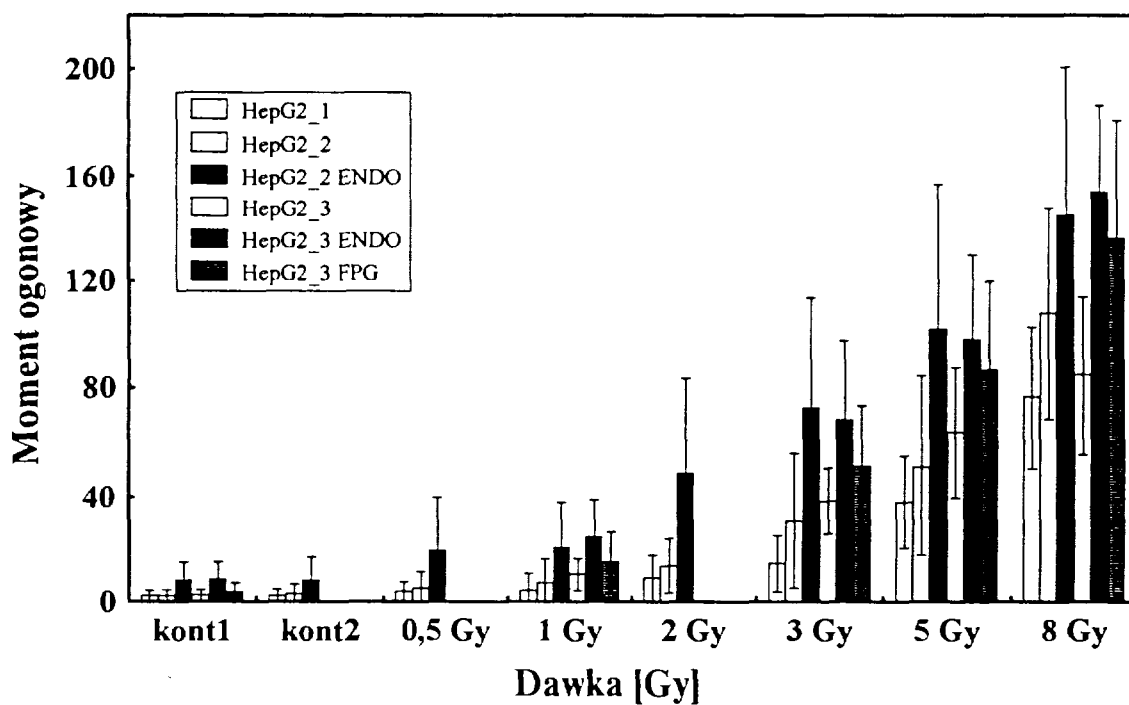
Liczba komórek



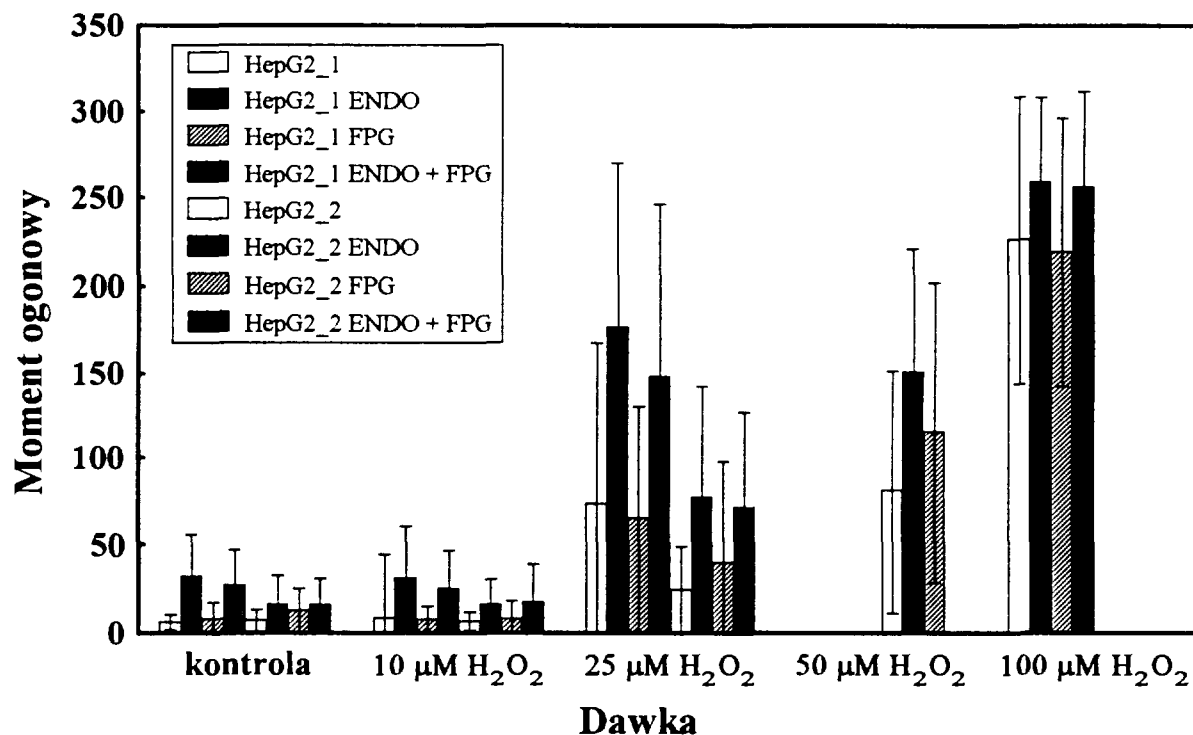
Rys.4. Histogramy rozkładów uszkodzeń w czasie naprawy DNA w ludzkich limfocytach napromienionych dawką 1,5 Gy.



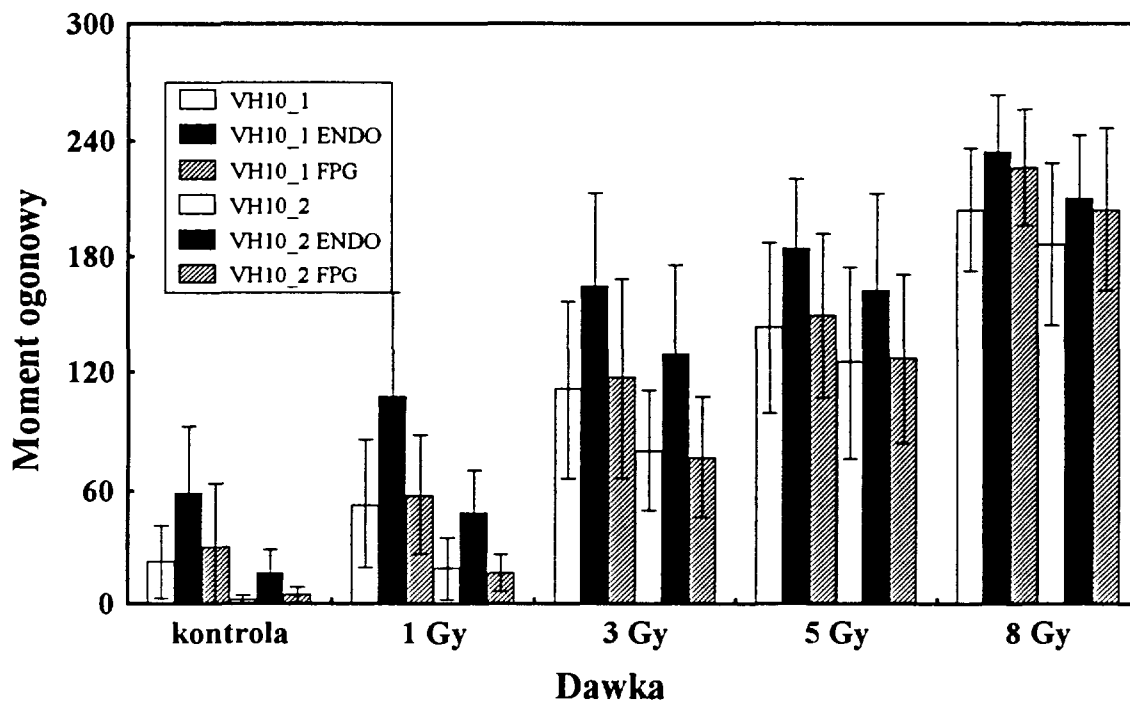
Rys.5. Naprawa DNA w ludzkich limfocytach napromienionych dawką 1,5 Gy. Szybkość naprawy ilustruje dopasowana komputerowa krzywa wykładnicza. Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.



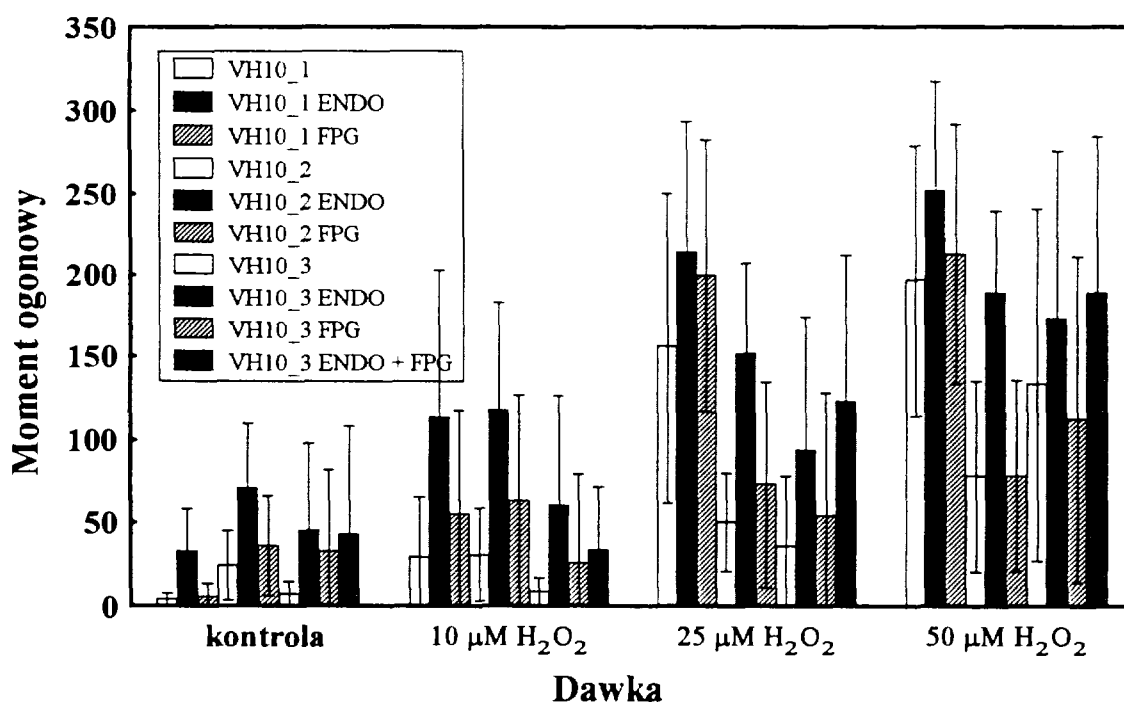
Rys.6. Uszkodzenia indukowane różnymi dawkami promieniowania X w komórkach Hep G2 w obecności i bez enzymów ENDO III i FPG (Hep G2-1, -2, -3 oznacza kolejne doświadczenia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.



Rys. 7. Uszkodzenia indukowane różnymi dawkami nadtlenu wodoru w komórkach Hep G2 w obecności i bez enzymów ENDO III i FPG (Hep G2-1, -2, -3 oznacza kolejne doświadczenia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.



Rys. 8. Uszkodzenia indukowane różnymi dawkami promieniowania X w komórkach VH10 w obecności i bez enzymów ENDO III i FPG (VH10-1, -2 oznacza kolejne doświadczenia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.



Rys.9. Uszkodzenia indukowane różnymi dawkami nadtlenu wodoru w komórkach VH10 w obecności i bez enzymów ENDO III i FPG (VH10-1, -2, -3 oznacza kolejne doświadczenia). Na rysunku zaznaczono odchylenie standardowe.

4. PODSUMOWANIE

Test kometkowy wynaleziony w 1984 roku [2], a zmodyfikowany i wprowadzony do powszechnego użycia w 1988 roku [3], stanowi przydatne narzędzie do badania uszkodzeń DNA na poziomie komórkowym. Metodą tą można wykryć pojedynczo- i podwójnoniciowe pęknięcia DNA, uszkodzenia oksydacyjne, dimery pirymidynowe i fotoprodukty 6-4, wiązania krzyżowe DNA-DNA i DNA-białko. Metoda znalazła zastosowanie w badaniach uszkodzeń DNA i ich naprawy, biomonitoringu oraz do oceny napromienienia żywności. Innym ciekawym zastosowaniem metody jest ocena naprawy uszkodzeń DNA *in situ*. Pierwsze doniesienia wskazują, że testem kometkowym można także badać naprawę uszkodzeń DNA w układach bezkomórkowych. Dotychczas badania takie wykonywano, stosując uszkodzony DNA plazmidowy. Użycie nukleoidów powstających podczas obróbki komórek metodą kometkową ma przewagę nad użyciem DNA plazmidowego, ponieważ nukleoidy częściowo zachowują strukturę chromatyny, a zatem bada się naprawę DNA o strukturze przypominającej występującą w naturze.

Z uwagi na łatwość wykonania i niewielki koszt jednostkowy analizy oraz wiele zastosowań metoda znajduje coraz więcej zwolenników w kraju i na świecie.

5. LITERATURA

- [1]. Rydberg, B., Johanson, K., Mammalian Cells, w: DNA Repair Mechanisms. Academic Press New York (1978), pp.465-468.
- [2]. Östling O, Johanson K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 123, 291-298 (1984).

- [3]. Singh, N., Mccoy, M., Tice, R., Schneider, E., *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191 (1988).
- [4]. Lebkowski, J., Laemmler, U., *J. Mol. Biol.*, 156, 309-324 (1982).
- [5]. Gedik, C., Ewen, S., Collins, A., *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 313-320 (1992).
- [6]. Singh, N., Tice, R., Stephens, R., Schneider, E., *Mutat. Res.*, 252, 289 (1991).
- [7]. Singh, N., Stephens, R., Schneider, E., *Int. J. Radiat. Biol.*, 66, 23-28 (1994).
- [8]. Vijayalaxmi, Tice, R., Strauss, G., *Mutat. Res.*, 271, 243-252 (1992).
- [9]. Olive, P., Włodek, D., Banath, J., *Cancer. Res.*, 51, 4671-4676 (1991).
- [10]. Elia, M., Deluca, J., Bradley, M., *Pharmacol. Ther.*, 51, 291-327 (1991).
- [11]. Collins, A., Dobson, V., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R., *Mutat. Res.*, w druku.
- [12]. Nakabeppu, Y., Yamashita, K., Sekiguchi, M., *J. Biol. Chem.*, 257, 2556-2562 (1982).
- [13]. Collins, A., Duthie, S., Dobson, V., *Carcinogenesis*, 14, 1733-1735 (1993).
- [14]. Evans, M., Podmore, I., Daly, G., Perrett, D., Lunec, J., Herbert, K., *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 434 (1995).
- [15]. Olive, P., Włodek, D., Durand, R., Banath, J., *Exp. Cell Res.*, 198, 259-267 (1992).
- [16]. Olive, P., Banath, J., Evans, H., *Brit. J. Cancer*, 67, 522 (1993).
- [17]. Demeo, M., Laget, M., Castegnaro, M., Dumenil, G., *Mutat. Res.*, 260, 295-306 (1991).
- [18]. Smets, L., *Anti-Cancer Drug*, 5, 3-9 (1994).
- [19]. Cerda, H., Hofsten, B., Johanson, K., Identification of Irradiated Food by Microelectrophoresis of DNA from Single Cells. w: Workshop on Recent Advances of New Methods of Detection of Irradiated Food. Ancona, 24-26 September 1991, Brussels, Commission of the European Communities.

Symbol UKD: 57.087

Symbol INIS: C11.00

Słowa kluczowe: TEST KOMETKOWY, USZKODZENIA DNA